9 月 September
2020，63(9)：1070－1080

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http：//www. insect. org. cn
doi：10.16380/j. kcxb. 2020. 09. 004

桔小实蝇肽聚糖识别蛋白基因 *BdPGRP-SB*1 的克隆及功能鉴定

张迎新[1,2]，陈　冬[1,2]，张苏芸[1,2]，魏　冬[1,2,*]，王进军[1,2]

（1. 西南大学植物保护学院，昆虫学及害虫控制工程重庆市重点实验室，重庆 400715；2. 西南大学农业科学研究院，重庆 400715）

摘要：【目的】为探究肽聚糖识别蛋白(PGRP)基因 *BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 免疫中的作用。【方法】本研究利用 PCR 克隆桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 全长 cDNA 序列；利用生物信息学软件对该基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列特征进行分析。采用 RT-qPCR 分析 *BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇不同发育阶段(卵、幼虫、蛹、成虫)及 5 日龄成虫不同组织(中肠、马氏管、后肠、脂肪体、卵巢和精巢)中的表达模式；对桔小实蝇 5 日龄雌成虫分别注射大肠杆菌 *Escherichia coli* 0111：B4 肽聚糖(PGN-EB)和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 肽聚糖(PGN-SA)后检测 *BdPGRP-SB*1 表达水平变化。利用 RNAi 沉默 *BdPGRP-SB*1 的表达，测定大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导后桔小实蝇雌成虫的死亡率及大肠杆菌诱导后抗菌肽(AMP)基因 *attacin-A*，*defensin* 和 *diptercin* 表达变化情况。【结果】克隆获得桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号：MN892482)，开放阅读框长 558 bp，编码 185 个氨基酸，其编码蛋白预测分子量为 21.45 kD，等电点为 8.57。序列分析表明，BdPGRP-SB1 无跨膜结构域，具有 PGRP 保守结构域，前端具有信号肽，为分泌型蛋白；具有 Zn^{2+} 依赖性酰胺酶活性和 DAP 型肽聚糖识别位点。系统进化分析发现，BdPGRP-SB1 与辣椒实蝇 *B. latifrons* 的 PGRP-SB1 亲缘关系最近，氨基酸序列一致性达 96%。发育表达模式表明，*BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇 3 日龄幼虫和成虫期高表达；组织表达谱结果显示 *BdPGRP-SB*1 在 5 日龄成虫各组织中均有表达，在脂肪体内表达量最高。PGN-EB 和 PGN-SA 均能诱导桔小实蝇雌成虫体内 *BdPGRP-SB*1 表达水平变化。通过 RNAi 抑制 *BdPGRP-SB*1 表达后，注射大肠杆菌导致桔小实蝇雌成虫死亡率显著升高，以及 *attacin-A*，*defensin* 和 *diptercin* 表达量显著上调。【结论】结果说明桔小实蝇 BdPGRP-SB1 参与识别革兰氏阴性细菌，并可能参与桔小实蝇 Imd 途径调控其免疫反应。

关键词：桔小实蝇；肽聚糖识别蛋白；基因克隆；免疫；革兰氏阴性细菌

中图分类号：Q965　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2020)09-1070-11

Cloning and functional characterization of the peptidoglycan recognition protein gene *BdPGRP-SB*1 in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

ZHANG Ying-Xin[1,2], CHEN Dong[1,2], ZHANG Su-Yun[1,2], WEI Dong[1,2,*], WANG Jin-Jun[1,2]

(1. Chongqing Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract:【Aim】To explore the role of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene, *BdPGRP-SB*1, in the immunity of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*.【Methods】The full-length cDNA sequence of *BdPGRP-SB*1 of *B. dorsalis* was cloned by PCR. The nucleotide and amino acid sequence

基金项目：现代农业产业(柑橘)技术体系岗位科学家经费(CARS-27)；国家自然科学基金项目(31601640)

作者简介：张迎新，女，1995 年 2 月生，重庆潼南人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理与分子生物学，E-mail：zyxin1995@163.com

[*] 通讯作者 Corresponding author，E-mail：dong_wei1988@yahoo.com

收稿日期 Received：2020-02-12；接受日期 Accepted：2020-03-23

characteristics of this gene were analyzed using bioinformatics software. The relative expression levels of *BdPGRP-SB*1 in different developmental stages (egg, larva, pupa and adult) and tissues (midgut, Malpighian tubules, hindgut, fat body, ovary and testis) of the 5-day-old adult of *B. dorsalis* were analyzed by RT-qPCR. The expression levels of *BdPGRP-SB*1 in the 5-day-old female adults of *B. dorsalis* injected with the peptidoglycan PGN-EB from *Escherichia coli* 0111∶B4 and PGN-SA from *Staphylococcus aureus*, respectively, were detected by RT-qPCR. After the expression of *BdPGRP-SB*1 was suppressed by RNAi, the mortality of female adults of *B. dorsalis* post injection of *E. coli* and *S. aureus* and the expression levels of three antimicrobial peptide (AMP) genes including *attacin-A*, *defensin* and *diptercin* in female adults of *B. dorsalis* post infection of *E. coli* were assayed.【Results】 The full-length cDNA sequence of *BdPGRP-SB*1 (GenBank accession no.: MN892482) was successfully cloned, and its ORF is 558 bp in length, encoding a protein of 185 amino acid residues with a predicted molecular weight of 21.45 kD and a theoretical pI of 8.57. Sequence analysis indicated that BdPGRP-SB1 is a secreted protein with a signal peptide and a conserved PGRP domain but without transmembrane domain, and has the Zn^{2+}-dependent amidase activity and the recognition sites of DAP-type peptidoglycan. Phylogenetic analysis indicated that BdPGRP-SB1 is the most closely related to PGRP-SB1 of *B. latifrons*, sharing 96% amino acid sequence identity. The developmental expression profile revealed that *BdPGRP-SB*1 was highly expressed in the 3-day-old larva and adult of *B. dorsalis*, and the tissue expression profile showed that it was expressed in various tissues of the 5-day-old adults, with the highest expression level in fat body. Both PGN-EB and PGN-SA induced the expression of *BdPGRP-SB*1 in female adults of *B. dorsalis*. After the suppression of *BdPGRP-SB*1 expression by RNAi, *E. coli* infection resulted in significantly higher mortality and significant up-regulation of *attacin-A*, *defensin* and *diptercin* in female adults of *B. dorsalis*.【Conclusion】The results suggest that *BdPGRP-SB*1 is involved in the recognition of gram-negative bacteria and may participate in Imd pathway to regulate immune response in *B. dorsalis*.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; peptidoglycan recognition protein; gene cloning; immunity; gram-negative bacteria

先天免疫是昆虫抵御微生物感染的重要防线，该免疫过程主要包括细胞免疫和体液免疫，两者共同作用对昆虫起到有效的保护（Lemaitre and Hoffmann, 2007；陈康康和吕志强, 2014）。细胞免疫通过血细胞介导完成，包括吞噬作用、集结作用和包囊作用（Lavine and Strand, 2002）；体液免疫通过抗菌肽（antimicrobial peptides, AMPs）和黑化反应来抵御病原体（Kimbrell and Beutler, 2001；Hultmark, 2003）。肽聚糖识别蛋白（peptidoglycan recognition proteins, PGRPs）在昆虫抵御微生物的先天免疫中具有重要作用（Liu *et al*., 2001；Lu *et al*., 2020）。PGRP 可识别细菌细胞壁中的肽聚糖（peptidoglycan, PGN），进而激活 Toll 途径和 Imd 途径，触发抗菌肽产生（Hultmark, 2003；Beutler, 2004；Wang *et al*., 2019）。其中 Toll 途径由革兰氏阳性细菌和真菌激活，而 Imd 途径由革兰氏阴性细菌激活（Lemaitre, 2004；Lemaitre and Hoffmann, 2007；Hetru and Hoffmann, 2009）。所有革兰氏阴性菌和一部分革兰氏阳性菌（如芽孢杆菌）的 PGN 在肽链第 3 个位点具有一个内消旋-二氨基庚二酸残基，而其他的革兰氏阳性菌在该处具有一个 L-赖氨酸（Lys）残基（Schleifer and Kandler, 1972；陈康康和吕志强, 2014）。

Yoshida 等（1996）在家蚕 *Bombyx mori* 血淋巴中首次纯化出 PGRP 蛋白，分子量约为 19 kD，可与肽聚糖结合并激活酚氧化酶途径。随后在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等昆虫中也发现了许多 PGRP 基因（Kang *et al*., 1998；Werner *et al*., 2000；Christophides *et al*., 2002；Yu *et al*., 2002）。从脊椎动物到无脊椎动物，PGRP 分布广泛且进化保守，根据其长度可分为长型 PGRP（PGRP-L）和短型 PGRP（PGRP-S）（Werner *et al*., 2000；Christophides *et al*., 2002）。目前在果蝇中鉴定到 13 个 PGRP 基因，其中有 7 个短型 PGRP 基因，包括

PGRPS-SA， *PGRP-SB*1， *PGRP-SB*2， *PGRP-SC1a*， *PGRP-SC1b*，*PGRP-SC*2 和 *PGRP-SD*(Werner *et al*.，2000；Kurata，2014)。短型 PGRP 是具有信号肽的细胞外蛋白，广泛分布于血淋巴、表皮和脂肪体中，也有少量在肠道表皮细胞和血细胞中分布(Myllymaki *et al*.，2014)。

在果蝇中，许多 PGRP 都充当了 Toll 通路和 Imd 途径的激活剂和调节剂(Dziarski，2004；Wang *et al*.，2019)。果蝇 PGRP-SA 和 PGRP-SD 是在血淋巴中循环的分泌蛋白，其响应革兰氏阳性细菌的 Lys 型 PGN，从而激活 Toll 途径(Michel *et al*.，2001；Bischoff *et al*.，2004)。PGRP-LF 对 NF-kB/Imd 通路的负调控诱导果蝇细胞正常凋亡，以确保果蝇正常发育(Tavignot *et al*.，2017；Lu *et al*.，2020)。PGRP-LB，PGRP-SC1a/b 和 PGRP-SC2 对革兰氏阴性细菌敏感，是 Imd 通路的负调控因子，可防止宿主过度激活免疫反应，对昆虫起到保护作用(Paredes *et al*.，2011)。PGRP-SC1a/b 和 PGRP-SC2 负责去除糖链上的多肽，与 PGRP-LB 和 Pirk 一起负调控 Imd 通路(Paredes *et al*.，2011)，Toll 通路的完全激活也需要 PGRP-SC1 和 PGRP-SC2 的参与(Costechareyre *et al*.，2016)。果蝇 PGRP-SB1 被证明在脂肪体内通过 Imd 途径活化后大量分泌到血淋巴中，且具有酰胺酶活性，但并未有相应的表型(Mellroth *et al*.，2003；Zaidman-Rémy *et al*.，2006，2011)。

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 属于双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae)果实蝇属 *Bactrocera*，为重要的世界性检疫害虫(Clarke *et al*.，2005；Liu *et al*.，2019)。在桔小实蝇中，对 PGRPs 的研究还相对较少。最近有研究表明，桔小实蝇 BdPGRP-SA 和 BdPGRP-SD 参与识别革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌，从而激活下游 *attacin-A*，*defensin* 和 *diptericin* 等 AMP 基因的表达以应对细菌感染(Wei *et al*.，2019)。为进一步分析桔小实蝇中其他的 PGRP，丰富对桔小实蝇中 PGRP 功能的认识，本研究克隆了桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 的 cDNA 全长序列，对其进行不同发育阶段和成虫不同组织的表达模式进行分析，利用 RNAi 抑制其表达水平进一步研究其功能，以探究 *BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇免疫中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

研究所用桔小实蝇 2008 年采自中国海南省海口市于室内饲养，饲养环境温度 27 ± 0.5℃、相对湿度 75% ± 5%、光周期 14L∶10D，采用人工饲料饲养(Wang *et al*.，2013)。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

收集不同发育阶段的试虫，包括：卵($n=100$)，第 1 ($n=100$)、3($n=100$)、5($n=10$)和 8 日龄($n=4$)幼虫，第 1，3，5 和 7 日龄蛹($n=4$)，以及第 1，3，5 和 7 日龄成虫($n=2$)。解剖 5 日龄成虫中肠、马氏管、后肠、脂肪体、卵巢和精巢等组织($n=20$)，使用 TRIzol(Invitrogen，美国)提取桔小实蝇不同发育阶段及成虫不同组织的总 RNA。每组样品设置 3 个生物学重复。使用 NanoDrop One 核酸蛋白测定仪(Thermo，美国)测定 RNA 浓度及质量，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用 RQ1 RNase-Free DNase 试剂盒(Promega，美国)去除基因组 DNA，以 500 ng 总 RNA 为模板按照 PrimeScript RT Reagent Kit 反转录试剂盒(TaKaRa，大连)说明书合成 cDNA 第 1 链。

1.3 *BdPGRP-SB*1 基因克隆

分别使用 Premier 6.0 软件(PREMIER Biosoft，美国)和 DNAMAN 5.0(Lynnon Biosoft，美国)设计和评估全长 PCR 引物(表 1)。使用桔小实蝇 5 日龄成虫 cDNA 为模板，扩增目的基因，反应体系(25 μL)：cDNA 模板 1 μL，上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL，Primer STAR Max Premix(2 ×)(TaKaRa，大连) 5 μL，ddH$_2$O 9.5 μL。PCR 反应条件：94℃ 3 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，34 个循环；72℃ 10 min(Wei *et al*.，2018)。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，根据 Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver 4.0 胶回收试剂盒(TaKaRa，大连)说明书纯化回收目的条带；将纯化的片段连接到 pGEM-T Easy 载体(Promega，美国)中；将连接产物转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)；用通用 M13 引物筛选阳性克隆送至深圳华大基因科技有限公司进行测序确认。

1.4 生物信息学分析

利用 ORF Finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi)获得 PGRP 基因序列；利用 ProtParam(http://web.expasy.org/protparam)预测分子量和等电点；利用 InterPScan 5(http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5)分析 PGRP 蛋白序列的功能结构域；分别使用在线软件 SignalP 4.1 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-

4.0）和 TMHMM Server 2.0（http：// www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM-2.0）分析信号肽和跨膜结构域；NCBI 上查找其他昆虫的 PGRP 序列，使用 CLUSTALX 2.0 进行多序列比对分析，并使用 Jalview 软件 2.9（Waterhouse *et al.*，2009）进行多序列编辑；MEGA 5 软件的邻接（neighbor-joining，NJ）法构建桔小实蝇 BdPGRP-SB1 和其他物种 PGRPs 的系统发育树，设置 1 000 次 bootstraps 进行检验。

1.5　*BdPGRP-SB*1 时空表达模式检测

使用 Primer Premier 3（http：// fokker. wi. mit. edu/primer3）设计定量引物（表 1）。检测肽聚糖识别蛋白基因 *BdPGRP-SB*1 的表达量，使用 Novostar-SYBR SuperMix 试剂盒（Novoprotein，上海）和 CFX384™ Real-Time PCR Detection System 实时荧光定量仪（Bio-Rad，美国）分析其在不同发育阶段和不同成虫组织中的表达模式。RT-qPCR 体系（10 μL）：cDNA 模板 0.5 μL，上下游引物（10 mmol/L）各 0.5 μL，qPCR SuperMix 5 μL，无核酶水 3.5 μL。qPCR 反应条件：95℃ 2 min；95℃ 15 s，60℃ 30 s，40 个循环；60℃ 1 min；95℃ 10 min（Wei *et al.*，2018）。以桔小实蝇 *α-Tubulin*（GenBank 登录号：GU269902）为内参基因（Shen *et al.*，2010）。

1.6　细菌肽聚糖诱导 *BdPGRP-SB*1 基因表达

将大肠杆菌 *E. coli* 0111：B4 肽聚糖（PGN-EB）和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 肽聚糖（PGN-SA）（InvivoGen，美国）用无菌水稀释至 100 μg/mL 分别注射桔小实蝇 5 日龄雌成虫，每头虫 200 nL，等体积无菌水作为对照，每个处理设置 3 个生物学重复，每个重复包含 3 头雌虫。在注射后 3，6，9，12 和 24 h 后取样提取总 RNA，利用 RT-qPCR 技术（反应体系及条件同 1.5 节），将对照组中基因表达量作为 1，用于分析 *BdPGRP-SB*1 在肽聚糖诱导后的表达变化。

1.7　RNAi 实验

使用特异性引物（表 1）通过 PCR 扩增目的基因片段，使用 Transcript Aid T7 High Yield Transcription Kit 试剂盒（Thermo，美国），按说明书以扩增出来的目的片段为模版合成双链 RNA（dsRNA）。使用 NanoDrop One 核酸蛋白测定仪（Thermo，美国）测量 dsRNA 浓度，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的完整性。将 dsRNA 稀释至 4 000 ng/μL 左右，使用 Nanoject II Auto-Nanoliter Injector（WPI，美国）将 dsRNA 注射入桔小实蝇雌成虫腹部末端，每头虫注射 2 000 ng，等量 ds*GFP* 作为对照。分别在注射 dsRNA 之后 24 和 48 h 后收样提取总 RNA 用于检测目的基因沉默效率，反应体系及条件同 1.5 节，每个处理收集 3 个生物学重复，每个生物学重复包含 3 头雌虫。

在注射 dsRNA 24 h 后，分别注射 200 nL OD_{600} 为 1.8 的革兰氏阴性细菌大肠杆菌 DH5α 和 200 nL OD_{600} 为 0.3 的革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌，每个处理包括至少 30 头试虫，统计注射后 5 d 内的存活率。

RNAi 处理试虫后 24 h 注射 200 nL OD_{600} 为 1.8 的灭活大肠杆菌，以注射 ds*GFP* 和 PBS 为对照，24 h 后收集样品并且提取总 RNA，去基因组后反转录得到 cDNA，利用 RT-qPCR 检测抗菌肽基因表达量，反应体系及条件同 1.5 节。每个处理 3 个生物学重复，每个生物重复 3 头雌虫。参考桔小实蝇 *PGRP-SA* 和 *PGRP-SD* 的研究，选取 3 个抗菌肽基因 *attacin-A*（GenBank 登录号：KY038167），*defensin*（GenBank 登录号：KX510002）和 *diptericin*（GenBank 登录号：KJ488999）分析其表达量变化（Wei *et al.*，2019）。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

基因 Gene	正向引物（5′-3′） Forward primer	反向引物（5′-3′） Reverse primer	用途 Purpose
*BdPGRP-SB*1	TTTGACGTTGTCGAAAAGTGAG	TGCTTGACACTAAGAAGACCGAA	克隆 Cloning
*BdPGRP-SB*1	ACACAACTGCTGCGTTTCAT	TGTTCTTGATGAGGCGCTTG	RT-qPCR
attaacin-A	GCTCAAACAGCAAACACACAGT	CAACGATTGTGGGTATGCTG	
Cecropin	TTCGTTCTCCTGGCTGTCTT	ATCCCTTCAATGTTGCTGCC	
Defensin	ACCCACTGAAGGAGATAGCG	CGAGAACCACGCAATGACTT	
Diptercin	CCCAAAGACAGCCTCAGTTC	CTAAAAGTGTACTGGCCGCC	
α-Tubulin	CGCATTCATGGTTGATAACG	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	
*BdPGRP-SB*1	taatacgactcactatagggTGTTTTGCGCTCAGGAT	taatacgactcactatagggAAGTTTTGATTTCGTCGTA	RNAi
GFP	taatacgactcactatagggTGGGCACAAATTTTCTGTC	taatacgactcactatagggAAGGGTATCACCTTCAAAC	

T7 启动子的序列 T7 promoter sequence：taatacgactcactataggg.

1.8 数据分析

基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算(Livak and Schmittgen, 2001),基因时空表达模式分析中基因相对表达量使用单因素方差分析及最小显著差法(LSD)分析差异显著性;RNAi 和细菌诱导中死亡率和基因表达量差异显著性采用 Student 氏独立样本 *t* 检验进行分析,使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 *BdPGRP-SB1* 的克隆和序列分析

扩增获得桔小实蝇 *BdPGRP-SB1*(GenBank 登录号: MN892482),开放阅读框长 558 bp,编码 185 个氨基酸。其编码蛋白 BdPGRP-SB1 预测分子量为 21.45 kD,等电点为 8.57,无跨膜结构域,具有 PGRP 保守结构域(第42-181位氨基酸),前端含有 19 个氨基酸的信号肽,为分泌型蛋白。这些特征表明,BdPGRP-SB1 属于短型 PGRP。

选取果蝇、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、家蝇 *Musca domestica* 和家蚕 *Bombyx mori* 的同源氨基酸序列与 BdPGRP-SB1 氨基酸序列进行比对(图 1),昆虫 PGRPs 保守区域十分一致,结构域高度保守。BdPGRP-SB1 含有 3 个保守的半胱氨酸残基和 6 个 PGRP/酰胺酶活性所需的氨基酸残基,表明 BdPGRP-SB1 具有 Zn^{2+} 依赖性酰胺酶活性。Arg99 残基为 DAP 型 PGN 识别位点,表明 BdPGRP-SB1 可识别 DAP 型 PGN。

使用 MEGA 5 软件的邻接法联合桔小实蝇 BdPGRP-SB1 和其他物种 PGRPs 构建系统发育树,结果表明桔小实蝇 BdPGRP-SB1 与辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons* 的 PGRP-SB1 亲缘关系最近,氨基酸序列一致性达 96%(图 2)。

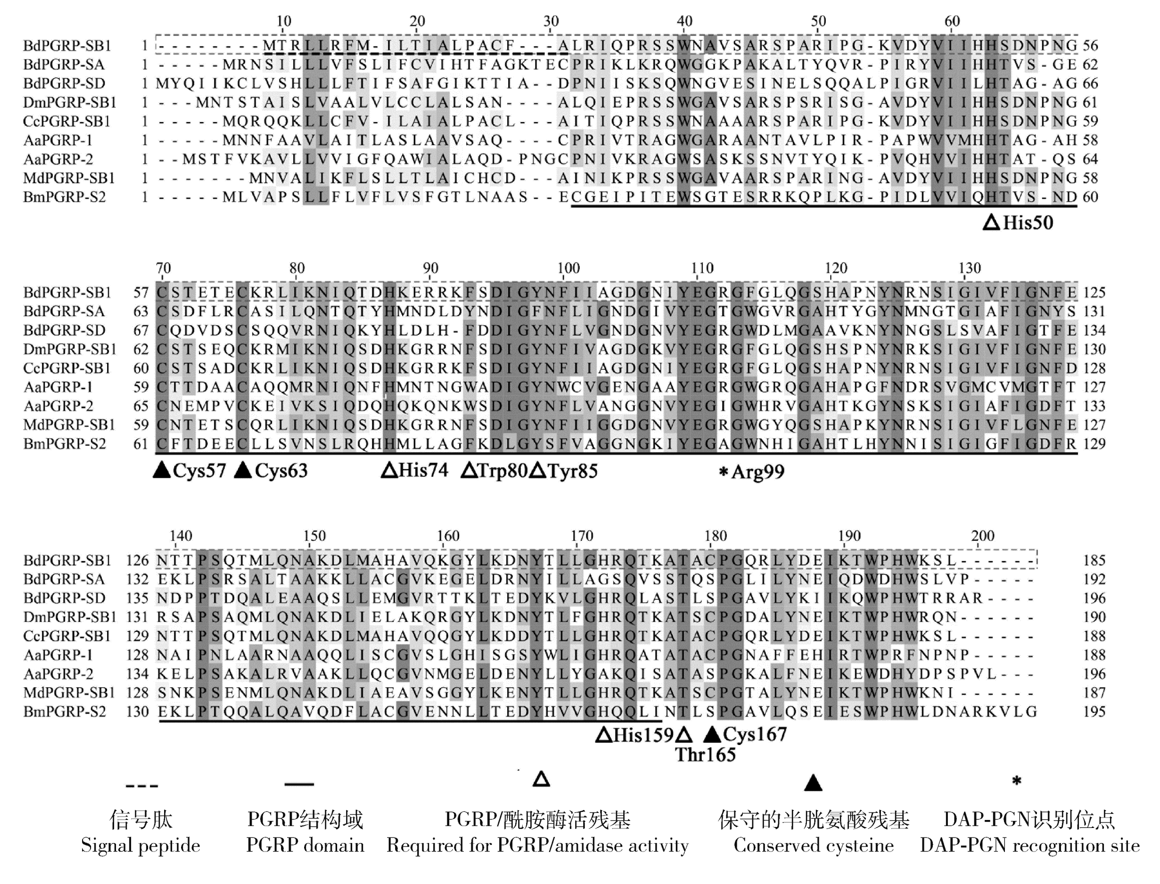


图 1 桔小实蝇 BdPGRP-SB1 和其他昆虫 PGRP 序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of BdPGRP-SB1 of *Bactrocera dorsalis* with PGRP proteins from other insects

PGRP 蛋白来源物种及其 GenBank 登录号 Origin species of PGRP proteins and their GenBank accession numbers: BdPGRP-SA: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, MK392505; BdPGRP-SD: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, MK392506; DmPGRP-SB1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, CAD89128.1; CcPGRP-SB1: 地中海实蝇 *Ceratitis capitate*, XP004537949; AaPGRP-1: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP001658086; AaPGRP-2: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP001660103; MdPGRP-SB1: 家蝇 *Musca domestica*, NP001295929.1; BmPGRP-S2: 家蚕 *Bombyx mori*, AHJ11178.

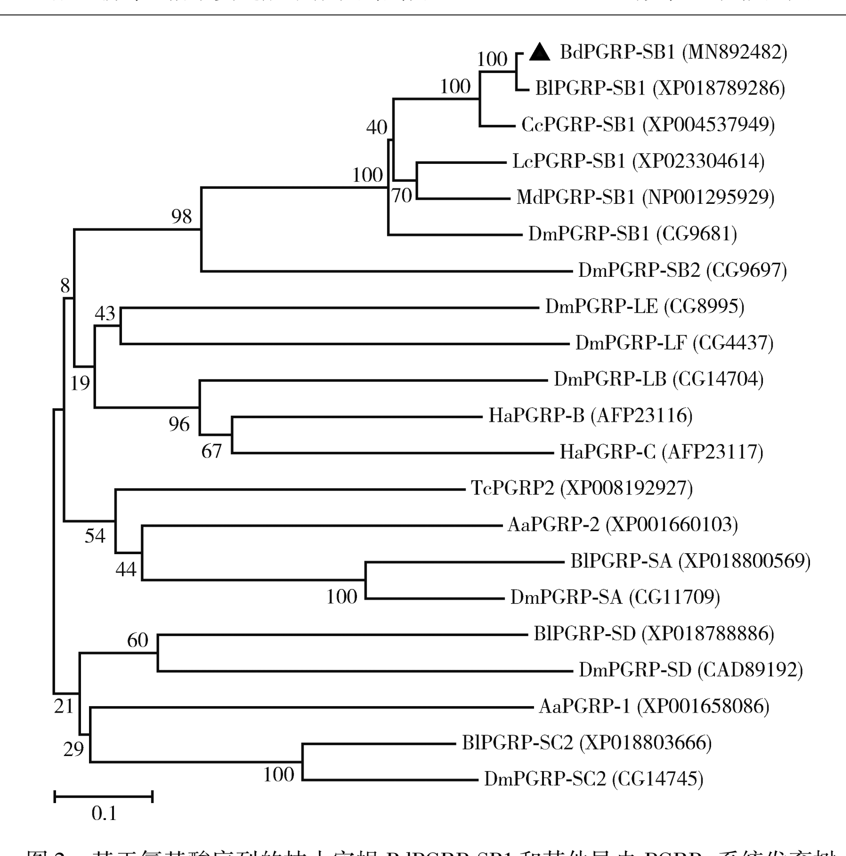


图 2　基于氨基酸序列的桔小实蝇 BdPGRP-SB1 和其他昆虫 PGRPs 系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of BdPGRP-SB1 from *Bactrocera dorsalis* and PGRP proteins from other insects based on amino acid sequences

使用 MEGA 5 软件的邻接法构建系统发育树，设置 1 000 次 bootstraps 进行检验。The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method of MEGA 5 with 1 000 bootstrap replicates. Aa：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Bl：辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons*；Cc：地中海实蝇 *Ceratitis capitate*；Dm：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；Lc：铜绿蝇 *Lucilia cuprina*；Md：家蝇 *Musca domestica*；Tc：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*.

2.2　*BdPGRP-SB*1 时空表达模式

以 *α-Tubulin* 作为内参基因，对桔小实蝇不同发育时期以及成虫不同组织中 *BdPGRP-SB*1 表达模式进行分析，结果显示：*BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇各阶段均有所表达，在 3 日龄幼虫、1 日龄蛹和成虫期高表达，显著高于在卵和其他日龄的幼虫及蛹中表达量（图 3：A），其中 3 日龄幼虫中表达量是卵期的 409 倍（$P<0.05$），1 日龄蛹中表达量是卵期的 257 倍（$P<0.05$），5 日龄成虫中的表达量是卵期的 543 倍（$P<0.001$）。*BdPGRP-SB*1 在成虫各组织中亦均有所表达，在脂肪体中表达量最高，其次是在中肠、后肠和精巢中，在马氏管和卵巢中表达水平较低（图 3：B）；*BdPGRP-SB*1 在脂肪体中的表达量是在卵巢中表达量的 30 倍（$P<0.001$），在中肠中的表达量是在卵巢中表达量的 20 倍（$P<0.001$）。

2.3　肽聚糖对 *BdPGRP-SB*1 转录水平的影响

注射大肠杆菌肽聚糖（PGN-EB）和金黄色葡萄球菌肽聚糖（PGN-SA）均能诱导桔小实蝇雌成虫体内 *BdPGRP-SB*1 表达水平变化（图 4）。*BdPGRP-SB*1 表达量在 PGN-EB 诱导后的多个时间点显著上调，在诱导 3 h 时最高，较对照上调 31 倍（$P<0.05$），随后逐渐下降，在诱导 6 h 时较对照上调 11 倍（$P<0.05$），在诱导 9 h 时较对照上调 10 倍（$P<0.05$），在诱导 24 h 时较对照仅上调 3 倍（$P<0.01$）（图 4：A）。*BdPGRP-SB*1 在 PGN-SA 诱导后的多个时间段也显著上调，在诱导 3 h 时较对照上调 9 倍（$P<0.05$），在诱导 6 h 时表达量最高，较对照上调 11 倍（$P<0.05$），随后逐渐下降，在诱导 9 h 时较对照上调 5 倍（$P<0.01$），在诱导 24 h 时较对照上调 3 倍（$P<0.05$）（图 4：B）。结果说明 *BdPGRP-SB*1 对 PGN-EB 更为敏感。

2.4　*BdPGRP-SB*1 基因功能分析

桔小实蝇 5 日龄雌成虫注射 ds*BdPGRP-SB*1 24 h 和 48 h 后 *BdPGRP-SB*1 均能被有效沉默，沉默效率分别为 55%（$P<0.01$）和 76%（$P<0.01$）（图 5：A）。利用 RNAi 干扰桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 表达

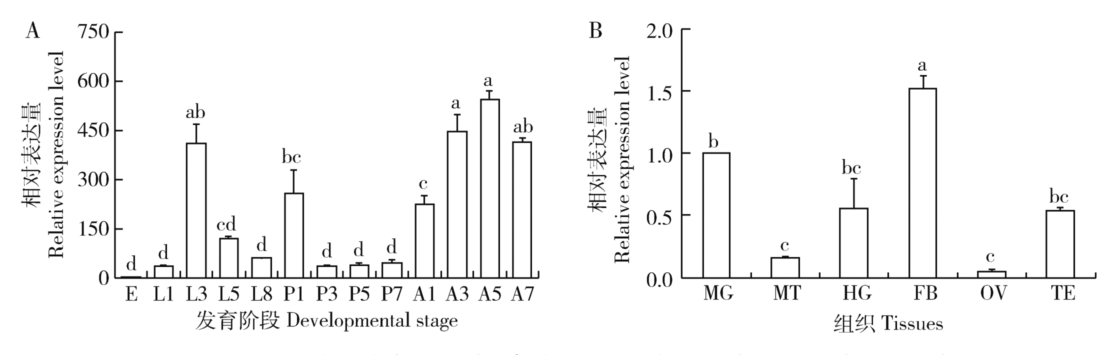


图 3 *BdPGRP-SB*1 在桔小实蝇不同发育阶段(A)和成虫不同组织(B)中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *BdPGRP-SB*1 in different developmental stages (A) and adult tissues (B) of *Bactrocera dorsalis*

E: 卵 Egg; L1 -8: 分别为 1, 3, 5 和 8 日龄幼虫 1, 3, 5 and 8-day-old larvae, respectively; P1 -7: 分别为 1, 3, 5 和 7 日龄蛹 1, 3, 5 and 7-day-old pupae, respectively; A1 -7: 分别为 1, 3, 5 和 7 日龄成虫 1, 3, 5 and 7-day-old adults, respectively. MG: 中肠 Midgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules; HG: 后肠 Hindgut; FB: 脂肪体 Fat body; OV: 卵巢 Ovary; TE: 精巢 Testis. 柱上不同小写字母表示不同发育阶段和不同组织间基因表达量差异显著($P<0.05$, LSD)。Different lowercase letters above bars indicate significant differences in the gene expression level between different developmental stages and different tissues ($P<0.05$, LSD).

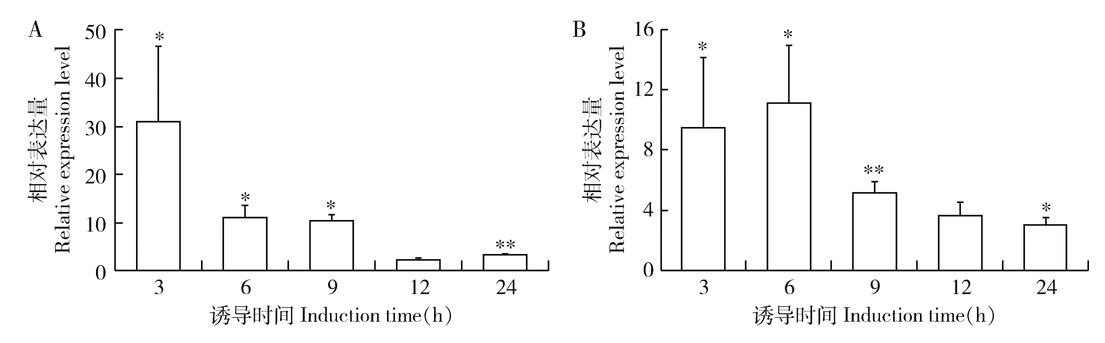


图 4 分别注射 PGN-EB (A)和 PGN-SA (B)后桔小实蝇 5 日龄雌成虫中 *BdPGRP-SB*1 的表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *BdPGRP-SB*1 in the 5-day-old female adults of *Bactrocera dorsalis* after injection of PGN-EB (A) and PGN-SA (B)

PGN-EB 和 PGN-SA 分别代表大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的肽聚糖。注射等量无菌水作为对照。在抗菌肽注射后 3, 6, 9, 12 和 24 h 收集试虫,将对照中基因表达量作为 1,利用独立样本 *t* 测验分析处理组和对照组之间的差异显著性($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$)。PGN-EB and PGN-SA represent peptidoglycan of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. An equal amount of ddH_2O was injected as the control. Flies were collected at 3, 6, 9, 12, and 24 h post injection. The relative expression level of *BdPGRP-SB*1 in the control was normalized to be 1. Significance of differences between the treatment group and the control group was determined via the independent samples *t*-test ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$).

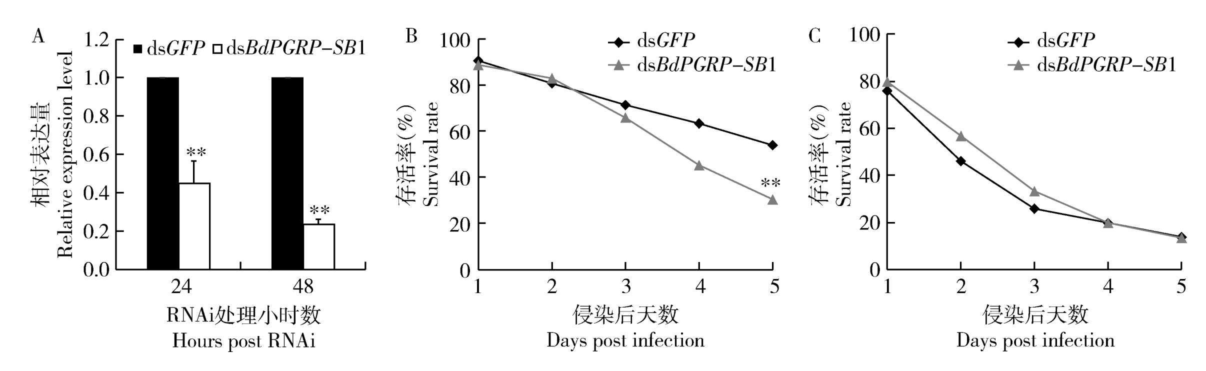


图 5 RNAi 后 *BdPGRP-SB*1 的沉默效率(A)以及大肠杆菌(B)和金黄色葡萄球菌(C)侵染桔小实蝇雌成虫的存活率

Fig. 5 The silencing efficiency of *BdPGRP-SB*1 (A) and the survival rates of female adults of *Bactrocera dorsalis* infected by *Escherichia coli* (B) and *Staphylococcus aureus* (C) after RNAi of *BdPGRP-SB*1

在注射 dsRNA 24 和 48 h 后收集试虫提取 RNA,利用 RT-qPCR 检测基因沉默效率。在注射基因特异性 dsRNA 24 h 后注射大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,统计 5 d 内的存活率,注射等量的 ds*GFP* 作为阴性对照。利用独立样本 *t* 测验分析处理组和对照组间的差异显著性($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$)。The tested insects were collected for RNA isolation at 24 and 48 h after dsRNA injection, and then the gene silencing efficiency was detected by RT-qPCR. *E. coli* and *S. aureus* were injected at 24 h after injection of gene-specific dsRNA, and the survival rates were calculated within 5 d. The group injected with the same amount of ds*GFP* was used as the negative control. The significance of difference between the treatment group and the control group was determined via the independent samples *t*-test ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$).

后，再分别注射大肠杆菌和金黄色葡萄球菌后桔小实蝇雌成虫在 5 d 内的存活率统计结果表明，在大肠杆菌注射组中 ds*BdPGRP-SB*1 处理组（30%）较对照组（54%）存活率显著性降低（$P<0.01$）（图 5：B），在金黄色葡萄球菌注射组中 ds*BdPGRP-SB*1 处理组存活率（13%）与对照组（14%）无显著差异（图 5：C）。说明 *BdPGRP-SB*1 参与桔小实蝇免疫系统对大肠杆菌的识别。

干扰 *BdPGRP-SB*1 后 24 h 注射灭活的大肠杆菌，桔小实蝇雌成虫中 *attacin-A*，*defensin* 和 *diptericin* 3 种抗菌肽基因的表达量与注射 ds*GFP* 和灭活 *E. coli* 的对照组相比表达上调（图 6），其中 *attacin-A* 上调 1.73 倍（$P<0.05$），*defensin* 上调 3.16 倍（$P<0.01$），*diptericin* 上调 1.68 倍（$P<0.05$）。表明 *BdPGRP-SB*1 参与识别大肠杆菌，抑制其表达后抗菌肽被激活。

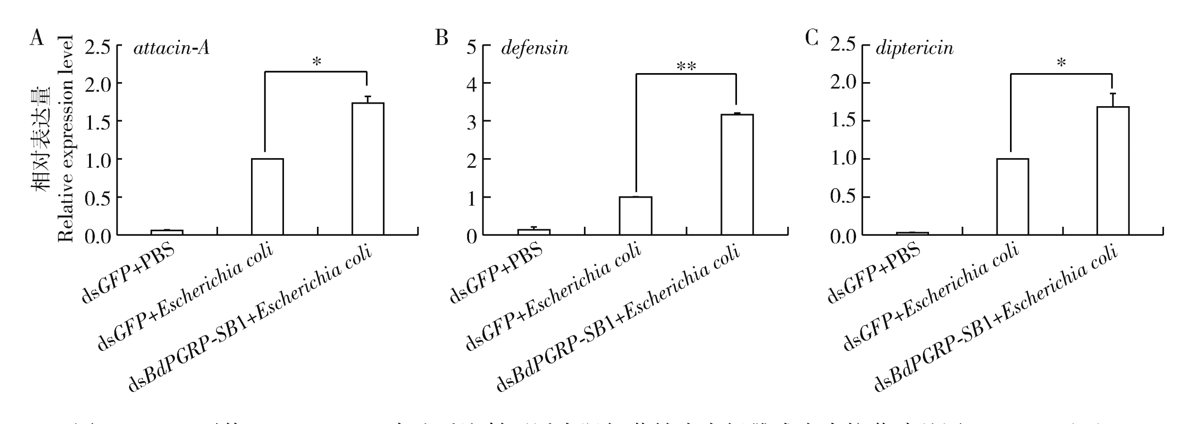


图 6 RNAi 干扰 *BdPGRP-SB*1 表达后注射灭活大肠杆菌桔小实蝇雌成虫中抗菌肽基因 *attacin-A*（A），*defensin*（B）和 *diptercin*（C）的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of antibacterial peptide genes *attacin-A* (A), *defensin* (B), and *diptercin* (C) in female adults of *Bactrocera dorsalis* after infection with inactivated *Escherichia coli* following RNAi of *BdPGRP-SB*1

RNAi 干扰 *BdPGRP-SB*1 24 h 后注射灭活的大肠杆菌，24 h 后收集样品，检测抗菌肽基因表达量。注射 ds*GFP* + PBS 和 ds*GFP* + *E. coli* 为对照组。利用独立样本 *t* 测验分析处理组与 ds*GFP* + *E. coli* 对照组间基因表达量的显著性差异（* $P<0.05$；** $P<0.01$）。Inactivated *E. coli* was injected at 24 h after RNAi of *BdPGRP-SB*1. Flies were collected at 24 h post injection of inactivated *E. coli* to analyze the expression level of antimicrobial peptide genes. The groups injected with ds*GFP* + PBS and ds*GFP* + *E. coli* were used as the control groups. The significance of difference in the gene expression level between the treatment group and the control group ds*GFP* + *E. coli* was determined via the independent samples *t*-test (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

3 讨论

昆虫依靠先天免疫防御微生物病原体，先天免疫包括细胞免疫和体液免疫，体液免疫可诱导的 AMPs 和血淋巴中活化的酚氧化酶级联反应（Royet *et al.*, 2005）。肽聚糖识别蛋白在昆虫识别细菌感染中起关键作用（Lemaitre and Hoffmann, 2007; Wang *et al.*, 2019）。本研究克隆获得到了桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 全长。序列分析（图 1）发现 BdPGRP-SB1 具有 Arg 残基，可识别 DAP 型 PGN，同时具有 5 个保守残基，具有 T7 溶菌酶 Zn^{2+} 依赖性酰胺酶活性，表明该基因可能参与具有 DAP 型 PGN 的革兰氏阴性细菌的识别。在果蝇中，同系物 PGRP-SB1 具有 N 端乙酰胞壁酸（N-acetylmuramoyl）和 L 端丙氨酸酰胺酶（L-alanine amidase），具有 T7 溶菌酶 Zn^{2+} 依赖性酰胺酶活性，对 DAP 型 PGN 具有较高活性，对大多数 Lys 型 PGN 活性较低（Mellroth and Steiner, 2006）。BdPGRP-SB1 与其他昆虫的 PGRP 系统发育树显示，其与辣椒实蝇 PGRP 亲缘关系较高（图 2），暗示着其功能上的保守性。

短型 PGRPs 广泛存在于昆虫血淋巴、表皮和脂肪体等组织中，它们主要在脂肪体细胞中合成，部分在肠道的表皮细胞中合成，也有少部分在血淋巴合成（Dziarski and Gupta, 2004）。昆虫脂肪体由富含脂质和糖原的松散细胞组成，除了具有能量储存和卵黄质前体合成的功能外，脂肪体还产生和分泌具有溶解活性的抗菌肽，以及体液免疫反应的一些其他成分，是防御病原物的重要免疫器官（Hillyer, 2015）。研究表明果蝇 *PGRP-SC*1，*PGRP-SC*2 和 *PGRP-LB* 在幼虫肠道中高表达，PGRP-SC2 同时为脂肪体中 Imd 途径的负调控因子（Costechareyre *et al.*, 2016）。桔小实蝇 *BdPGRP-SA* 和 *BdPGRP-SD* 在成虫脂肪体内高表达，其参与识别革兰氏阴性和

革兰氏阳性细菌，从而激活下游 AMPs 以应对细菌感染（Wei *et al*., 2019）。果蝇 *PGRP-SB*1 在脂肪体内大量产生，然后释放到血淋巴中（Zaidman-Rémy *et al*., 2011）。本研究关注的桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 属于短型 PGRP 基因，该基因在脂肪体中表达最高（图 3：B），说明该基因可能通过脂肪体在昆虫免疫中发挥重要作用。

昆虫 PGRP 可识别细菌细胞壁中的肽聚糖激活 Toll 途径和 Imd 途径（Hultmark, 2003; Hetru and Hoffmann, 2009）。在果蝇中，感染胡萝卜软腐欧文氏菌 *Erwinia carotovora* 会诱导 *PGRP-SC*1, *PGRP-SC*2 和 *PGRP-LB* 表达（Costechareyre *et al*., 2016）。*PGRP-SB*1 能被含有 DAP 型 PGN 的革兰氏阴性细菌激活，而含有 Lys 型 PGN 的革兰氏阳性细菌只能短暂且轻微地激活 *PGRP-SB*1。在缺乏 Imd 途径的突变果蝇中，革兰氏阴性细菌也无法诱导 *PGRP-SB*1 的表达（Zaidman-Rémy *et al*., 2011）。在本研究中，在 PGN-EB 和 PGN-SA 诱导后，桔小实蝇 *BdPGRP-SB*1 表达量显著增加，这表明 *BdPGRP-SB*1 可以被大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导（图 4），大肠杆菌诱导倍数比金黄色葡萄球菌多，而大肠杆菌为含有 DAP 型 PGN 的革兰氏阴性细菌（陈康康和吕志强，2014），说明 *BdPGRP-SB*1 对革兰氏阴性细菌更为敏感。

黑腹果蝇 *PGRP-LB* 和 *PGRP-SCs* 突变后饲喂胡萝卜软腐欧文氏菌，其存活率较野生型果蝇显著降低（Paredes *et al*., 2011）。在桔小实蝇中，抑制 *BdPGRP-SA* 和 *BdPGRP-SD* 后侵染大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，桔小实蝇死亡率均显著高于对照（Wei *et al*., 2019）。在本研究中，用大肠杆菌感染后，注射 ds*BdPGRP-SB*1 的桔小实蝇成虫存活率比对照降低了 24%；用金黄色葡萄球菌感染后，注射 ds*BdPGRP-SB*1 的桔小实蝇成虫存活率和对照相比无差异（图 5），表明 BdPGRP-SB1 参与大肠杆菌的识别过程。两种细菌的侵染结果表明，BdPGRP-SB1 主要参与革兰氏阴性细菌的识别，与 BdPGRP-SB1 序列分析可识别 DAP 型 PGN 的结果一致。但 *PGRP-SB*1 突变品系果蝇，对革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的耐受力与野生型果蝇相似，*PGRP-SB*1 的突变并没有引起其对细菌的敏感性增加（Zaidman-Rémy *et al*., 2011），可能因为不同物种之间基因功能存在差异。

在昆虫中，已鉴定出许多 AMPs。果蝇被胡萝卜软腐欧文氏菌或大肠杆菌侵染时，会诱导 AMPs 表达升高（Gobert *et al*., 2003）。果蝇中，抑制 Imd 通路的负调控因子 PGRP-LB 表达后，注射革兰氏阴性细菌或其肽聚糖和气管细胞毒素（tracheal cytotoxin, TCT）等惰性化合物，均能诱导 *diptericin* 表达量升高（Zaidman-Rémy *et al*., 2006）。不表达 Imd 通路的负调控因子 Pirk, PGRP-LB 和 PGRP-SCs 的果蝇在被细菌感染后，AMP 的表达水平是野生型果蝇的 8～10 倍，表明免疫反应受到负调节的高度限制（Paredes *et al*., 2011）。*PGRP-SB*1 突变品系在感染无害李斯特菌 *Listeria innocua*（具有 DAP 型 PGN 的革兰氏阳性细菌）24 h 后和感染大肠杆菌 6 h 后，*diptericin* 有轻微的上调，Imd 途径轻度的过度激活表明 PGRP-SB1 作为负调节因子起到一定作用，在大多数情况下可能被更有效的负调节剂（如 PGRP-LB）所掩盖（Zaidman-Rémy *et al*., 2011）。*Attacin*, *diptericin*, *cecropin* 和 *defensin* 是昆虫中常见的 AMPs，且参与桔小实蝇免疫（Liu *et al*., 2017）。在本研究中，*BdPGRP-SB*1 沉默后注射灭活大肠杆菌，*attacin-A*, *defensin* 和 *diptericin* 3 种抗菌肽基因表达水平显著上升。Imd 途径的过度激活表明 *BdPGRP-SB*1 可能参与 Imd 途径的负调控。研究表明，过表达 *Imd* 可激活抗菌肽基因的表达，同时 *Imd* 的过表达会诱导细胞凋亡，对果蝇有害（Georgel *et al*., 2001）；Imd 途径负调节因子可防止过度免疫对果蝇的伤害（Paredes *et al*., 2011）。干扰 *BdPGRP-SB*1 后，抗菌肽基因表达量上调（图 6），Imd 途径被过度激活，导致桔小实蝇对革兰氏阴性细菌敏感性增加，说明 *BdPGRP-SB*1 可能参与 Imd 途径的负调控，以防止过度免疫对桔小实蝇的伤害。

参考文献（References）

Beutler B, 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol*., 40(12): 845–859.

Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J, 2004. Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of gram-positive bacteria. *Nat. Immunol*., 5(11): 1175–1180.

Chen KK, Lü ZQ, 2014. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in insects. *Acta Entomol. Sin*., 57(8): 969–978. [陈康康, 吕志强, 2014. 昆虫肽聚糖识别蛋白研究进展. 昆虫学报, 57(8): 969–978]

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler

L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu JN, Zheng LB, Bork P, Kafatos FC, 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 159–165.

Clarke AR, Armstrong KF, Carmichael AE, Milne JR, Raghu S, Roderick GK, Yeates DK, 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 293–319.

Costechareyre D, Capo F, Fabre A, Chaduli D, Kellenberger C, Roussel A, Charroux B, Royet J, 2016. Tissue-specific regulation of *Drosophila* NF-x03BA B pathway activation by peptidoglycan recognition protein SC. *J. Innate Immun.*, 8(1): 67–80.

Dziarski R, Gupta D, 2004. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.*, 7(8): 232.

Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Reichart JM, Hoffmann JA, 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev. Cell*, 1(4): 503–514.

Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D, 2003. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*, 302(5653): 2126–2130.

Hetru C, Hoffmann JA, 2009. NF-kappa B in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1: a000232.

Hillyer JF, 2015. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.*, 58: 102–118.

Hultmark D, 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, 15: 12–19.

Kang DW, Liu G, Lundstrom A, Gelius E, Steiner H, 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(17): 10078–10082.

Kimbrell DA, Beutler B, 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.*, 2(4): 256–267.

Kurata S, 2014. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 42(1): 36–41.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1295–1309.

Lemaitre B, 2004. Landmark – The road to toll. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(7): 521–527.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.

Liu C, Xu ZJ, Gupta D, Dziarski R, 2001. Peptidoglycan recognition proteins-a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J. Biol. Chem.*, 276(37): 34686–34694.

Liu H, Zhang DJ, Xu YJ, Wang L, Cheng DF, Qi YX, Zeng L, Lu YY, 2019. Invasion, expansion, and control of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in China. *J. Integr. Agr.*, 18(4): 771–787.

Liu SH, Wei D, Yuan GR, Jiang HB, Dou W, Wang JJ, 2017. Antimicrobial peptide gene cecropin-2 and defensin respond to peptidoglycan infection in the female adult of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 206: 1–7.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Lu YZ, Su FH, Li QL, Zhang J, Li YJ, Tang T, Hu QH, Yu XQ, 2020. Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 102: 9.

Mellroth P, Karlsson J, Steiner H, 2003. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.*, 278(9): 7059–7064.

Mellroth P, Steiner H, 2006. PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350(4): 994–999.

Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865): 756–759.

Myllymaki H, Valanne S, Ramet M, 2014. The *Drosophila* imd signaling pathway. *J. Immunol.*, 192(8): 3455–3462.

Paredes JC, Welchman DP, Poidevin M, Lemaitre B, 2011. Negative regulation by amidase PGRPs shapes the *Drosophila* antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity*, 35(5): 770–779.

Royet J, Reichhart JM, Hoffmann JA, 2005. Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(1): 11–17.

Schleifer KH, Kandler O, 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 36(4): 407–477.

Shen GM, Jiang HB, Wang XN, Wang JJ, 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *BMC Mol. Biol.*, 11: 76.

Tavignot R, Chaduli D, Djitte F, Charroux B, Royet J, 2017. Inhibition of a NF-kB/Diap1 pathway by PGRP-LF is required for proper apoptosis during *Drosophila* development. *PLoS Genet.*, 13(1): e1006569.

Wang JJ, Wei D, Dou W, Hu F, Liu WF, Wang JJ, 2013. Toxicities and synergistic effects of several insecticides against the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 106(2): 970–978.

Wang Q, Ren M, Liu X, Xia H, Chen K, 2019. Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. *Mol. Immunol.*, 106: 69–76.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ, 2009. Jalview Version 2 – A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9): 1189–1191.

Wei D, Jia HT, Zhang MY, Li R, Smagghe G, Wang JJ, 2018. Comparative analysis of differential gene expression profiling of sex-bias fat body of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) identifying a new vitellogenin gene. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 111(2): 43–54.

Wei D, Liu YW, Zhang YX, Wang JJ, 2019. Characterization and function of two short peptidoglycan recognition proteins involved in the immunity of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insects*, 10(3): 79.

Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772-13777.

Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M, 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 271(23): 13854-13860.

Yu XQ, Zhu YF, Ma C, Fabrick JA, Kanost MR, 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1287-1293.

Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4): 463-473.

Zaidman-Rémy A, Poidevin M, Hervé M, Welchman DP, Paredes JC, Fahlander C, Steiner H, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2011. *Drosophila* immunity: analysis of PGRP-SB1 expression, enzymatic activity and function. *PLoS ONE*, 6(2): e17231.

(责任编辑：马丽萍)